Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf
Dir. Prof. Dr. P. Naumann

In vitro - Untersuchungen zur Einwirkung von Antibiotika auf mitogen-stimulierte Kaninchenlymphozyten

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine Bottenbruch
aus Krefeld

Krefeld 1982

Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf
Dir. Prof. Dr. P. Naumann

In vitro - Untersuchungen zur Einwirkung von Antibiotika auf mitogen-stimulierte Kaninchenlymphozyten

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine Bottenbruch
aus Krefeld

Krefeld 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Professor Dr. Brüster

Referent
gez.: Professor Dr. Brunner

Koreferent
gez.: Professor Dr. Schneider

In vitro - Untersuchungen zur Einwirkung von Antibiotika auf mitogen-stimulierte Kaninchenlymphozyten

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG

2. LITERATURÜBERSICHT

3. MATERIAL

4. METHODEN

5. VERSUCHSERGEBNISSE

5.1 Zusatz von Kontamination verhindernden Antibiotika zum Kulturmedium

5.2 Stimulationsraten bei PHA M bzw. Con A

5.3 Lymphozytenwachstumskinetik

5.4 Wirkung von Antibiotika auf mitogen-stimulierte Lymphozyten

5.5 Hemmung der Lymphozytentransformation bei im menschlichen Serum erreichbaren Antibiotikakonzentrationen

6. DISKUSSION

7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Einleitung

Das Immunsystem als körpereigener Abwehrmechanismus kann eingedrungene Krankheitserreger erkennen und gezielt bekämpfen. Je nach der Struktur ihrer Antigene werden spezifische Antikörper gegen die Erreger gebildet. Dieses Immunsystem ist genetisch festgelegt und funktioniert nicht oder nicht ausreichend bei einem Wirtsorganismus mit geschädigter Resistenzlage. Die Chemotherapie, im besonderen die antibakterielle Chemotherapie, hat in solchen Versagensfällen erstaunliche Erfolge gebracht. Letztlich stellt jedoch das Immunsystem die entscheidende Instanz zur Beseitigung der Bakterien dar. Es ist daher wichtig, ob und wenn ja, welchen Einfluß antibakterielle Chemotherapeutika auf das körpereigene Immunsystem haben. Bei der Auseinandersetzung mit bakteriellen Krankheitserregern spielen die T-Lymphozyten des peripheren Blutes eine wichtige Rolle. Beim Zusammentreffen mit einem bakteriellen Antigen kommt es zur Stimulation der T-Lymphozyten, die sich in einer Transformation zu blastenförmigen Zellen äußert. Dabei findet eine Steigerung der Zellstoffwechselvorgänge statt. Die Steigerung der DNA-Synthese läßt sich in vitro quantitativ durch Einbau von ^{3}H-markiertem Thymidin erfassen.

Einige Bakterienantigene sind als spezifische Stimulatoren für die T-Lymphozyten bekannt. Nachteile der in vitro Testung der spezifischen Stimulation durch bakterielle Antigene sind die lange Kulturdauer von mindestens fünf Tagen und die geringe Stimulationsrate. Die Zahl der primär antigenreaktiven Zellen liegt auch bei hochgradiger Sensibilisierung kaum über 1 % (1). Die Zahl der transformierbaren Zellen liegt bei 5 - 20 %, läßt sich aber quantitativ sehr schwer erfassen.

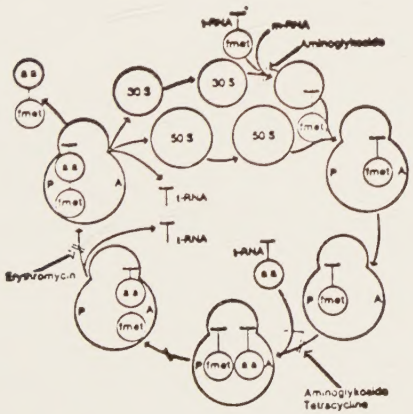
Andererseits rufen Mitogene, z.B. Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A), eine unspezifische Stimulation hervor mit dem Vorteil, daß hohe Proliferationsraten in kurzer Zeit (72 h) erreicht werden. Soweit heute bekannt, werden mit diesen unspezifischen Mitogenen nur T-Lymphozyten zur Proliferation angeregt (2).

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe der Lymphozytentransformation (LT) am Kaninchen versucht werden, eine quantitativ auswertbare Aussage über die Wirkung von Antibiotika auf T-Lymphozyten zu erhalten. Auf dieser Basis könnte später der Versuch zur quantitativen Bestimmung der Wirkung spezifischer Antigene auf die Lymphozytentransformation unter der Einwirkung von Antibiotika gemacht werden.
Zur Wirkung von Con A und PHA ist außerdem anzumerken, daß sie wie die meisten polyklonalen Mitogene im gleichen Maße "responder-" und "nonresponder-" Zellen zu binden vermögen (3). Unter den in der vorliegenden Arbeit gegebenen Versuchsbedingungen können Antworten auch bei Zellen induziert werden, die "nonresponder"-Zellen sind.

In dieser Arbeit wurde im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Autoren auf den Zusatz von Streptomycin und Penicillin zum Kulturmedium der Lymphozyten verzichtet. Aus der großen Zahl der heute verwendeten Antibiotika wurden in dieser Arbeit einige antibakterielle Chemotherapeuthika mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus ausgewählt. Die Frage, ob Antibiotika eine Wirkung auf die LT haben, ist besonders interessant bei den Antibiotika, die häufig in der Klinik angewendet werden und Einfluß auf die Zellstoffwechselvorgänge haben. Die bakterizid wirkenden

Penicillin und andere ß-Laktam-Antibiotika scheinen keinen Effekt auf die LT zu haben (4). In dieser Arbeit wurden daher Aminoglykoside (Gentamicin und Kanamycin), Tetracycline (Tetracyclin-HCl und Oxytetracyclin) und das Makrolidantibiotikum Erythromycin getestet. Tetracycline und Aminoglykoside gehören zu den häufig verwendeten Antibiotika, deren klinische Nebenwirkungen nicht unbedenklich sind. Falls sich außer diesen Nebenwirkungen auch noch eine Depression des Lymphozytenwachstums ergäbe, wäre das ein Anlaß, die Indikation für diese Antibiotika noch strenger zu stellen. Ein hemmender Effekt auf die LT könnte sich aus dem Wirkungsmechanismus dieser Antibiotika ableiten (Abb. 1), zumal es Hinweise gibt, daß einige Antibiotika nicht nur bei Prokaryonten, sondern auch bei Eukaryonten an dem pseudoplasmatischen 80S Ribosom misreading Effekte hervorrufen (28, 29).

Abb. 1: Ablauf der Proteinsynthese, Beispiel für die Darstellung eines Dipeptids (in Anlehnung an (5))



Zum Vergleich sind in der Tabelle I die bei Anwendung in der Klinik auftretenden Serumkonzentrationen angegeben (6).

Tabelle I: Mittlere Serumkonzentrationen von Antibiotika bei Normaldosis im menschlichen Organismus (unter Verwendung von Literatur (6))

Präparat	mittlere Serumkonzentration bei Normaldosis (/ug/ml)	
Tetracyclin	2,5 - 5	intravenös
	1,5 - 2,5	intramuskulär
	1,5 - 4	oral
Oxytetracyclin	2,5 - 5	intravenös
	1,5 - 2,5	intramuskulär
	1 - 2,4	oral
Kanamycin	30 (10-40-60)	intramuskulär
Gentamicin	3,5 (2 - 8)	intramuskulär
Erythromycin	2 - 10	intravenös
	2 - 8	intramuskulär
	2 - 4	oral

Mit der hier angewendeten Nachweismethode wird quantitativ entsprechend dem ^{3}H-Thymidin-Verbrauch die DNA-Synthese gemessen. Die hier angewendeten Antibiotika greifen zwar in die Proteinsynthese ein, aber die direkte gegenseitige Abhängigkeit von DNA-und Proteinsynthese rechtfertigt die Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens.

2. Literaturübersicht

Es sind bereits zahlreiche Arbeiten über die Wirkung der im folgenden untersuchten Antibiotika auf die LT menschlicher Lymphozyten erschienen. Dabei fanden sich widersprüchliche Ergebnisse. 1974 untersuchten W. C. Dam, F. D. Malkinson und H. Gewurz die Wirkung von Tetracyclin und Erythromycin in Konzentrationen von 4 µg/ml auf menschliche Lymphozyten unter Stimulation durch PHA. Sie konnten keine Einwirkung auf die LT feststellen (7).
1977 untersuchten M. Munster, C. Loadholdt, G. Leary und A. Barnes unter anderem Gentamicin, Tetracyclin und Oxytetracyclin in Konzentrationen von 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/ml unter Stimulation von PHA. Sie fanden bei den Tetracyclinen eine signifikante Hemmung der PHA induzierten Blastogenese. Gentamicin hatte einen leicht stimulierenden Effekt (4).
Im selben Jahr erschien eine Arbeit von J. H. Thong und A. Ferrante, die sich unter anderem mit der Wirkung von Tetracyclin und Oxytetracyclin in Konzentrationen von 1, 4 und 10 µg/ml beschäftigten. Sie beschrieben einen hemmenden Effekt auf durch PHA induzierte LT (8).

In der folgenden Tabelle II wurde versucht, die Literaturangaben tabellarisch zusammenzufassen. Die Werte der Quelle (8) wurden als Zahlenwerte aus der Arbeit übernommen, die der Quelle (4) aus den in der Arbeit gegebenen Kurven so genau wie möglich in Zahlenwerte übertragen.

Tabelle II: Bisher publizierte Ergebnisse der Einwirkung von Antibiotika auf die LT (Stimulation ist durch +, Hemmung durch - gekennzeichnet, Zahlenwerte in % der Kontrollen)

Mitogen	PHA Dosis (µg/ml)	Wirkung
Gentamicin	4	- 15 % (4)
	8	+ 10 % (4)
	16	+ 2 % (4)
	32	+ 5 % (4)
	64	+ 18 % (4)
Kanamycin	keine Literatur	
Tetracyclin	1	- 15,4 % (8)
	4	- 25 % (8)
	10	- 24 % (8)
	4	+ 12 % (4)
	8	+ 8 % (4)
	16	- 25 % (4)
	32	- 15 % (4)
	64	- 22 % (4)
Oxytetracyclin	1	- 14,4 % (8)
	4	- 26,4 % (8)
	10	- 23 % (8)
Erythromycin	4	0 % (7)

3. Material

Verwendete Versuchstiere und Materialien

Versuchstiere: Gesunde Hauskaninchen eines hiesigen Züchters

Zu den einzelnen Versuchsschritten wurden folgende Materialien verwendet:

Gewinnung der Lymphozyten (Blutabnahme):
- Heparin (Liquemin^{R} 25 000, Hoffmann-La Roche)
- sterile Einmalkanülen
- 10 ml-Einwegspritzen

Isolierung der Lymphozyten:
- 25 ml-Zentrifugenröhrchen (Duranglas)
- Silikonöl zum Silikonisieren der 25 ml Röhrchen (Serva Feinbiochemika Heidelberg)
- 100 ml-Glaskolben
- 10 ml-Glaspipetten
- Pasteurpipetten
- Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals Frankfurt)
- Hank's balanced salt-solution (HBSS, Gibco Glasgow)
- Hepes-Puffer
- RPMI 1640 (Boehringer Mannheim)
- Glutamin-Lösung (Boehringer Mannheim)
- Foetales Kälberserum (FCS, Virus & Mykoplasma getestet, Gibco Glasgow)
- Zählkammer Thoma

Bestimmung der Absterberate:
- Trypanblau

Ansetzen der Kulturen:

- Mikrotiterplatten (Greiner PS-Gewebekulturplatten, F-Form, oberflächenbehandelt, Greiner Nörtingen)
- Eppendorf Pipettierrechen
- Kunststoffpipettenspritzen
- PHA M (Difco Laboratories Detroit Michigan USA)
- Con A (Calbiochem Giessen)

Antibiotika:

- Gentamicin Sulfat (Sigma Chemie München)
- Kanamycin Sulfat (Sigma Chemie München)
- Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma Chemie München)
- Oxytetracyclin Dihydrat Hydrochlorid (Sigma Chemie München)
- Erythromycin Base (Serva Heidelberg)

Thymidieren:

- 250 Mikrocurie P 11 [Methyl-H3] Thymidin (^{3}H-Thymidin, Amersham Buchler Braunschweig)

Ernten der Kulturen:

- Millipore Eiweißbindungsfilter 0,5 µm (Millipore Neuisenburg)
- Methanol 5 %
- Trichloressigsäure 5 % (TCA)
- HBSS
- Proberöhrchen aus Kunststoff
- Filter Count TM (Packard Frankfurt)

Laboreinrichtung:

- Laminar Flow Bank
- Minifuge 2
- Autoklav
- Heißluftsterilisationsgerät
- CO_2-Brutschrank
- Millipore Vielfachfiltrationsgerät
- Szintillationszählgerät
- Mikroskop

Vorbereitung des Materials

Reagenzien

PHA M wurde entsprechend den Anleitungen der Firma Difco vorbereitet. Für den Versuch wurde PHA M in einer Konzentration von 10 µl/ml Kulturmedium verwendet, entsprechend 2 µl PHA M-Lösung pro Vertiefung der Mikrotiterplatte.

Con A wurde entsprechend der Anleitung der Firma Calbiochem vorbereitet. Es wurden Con A-Konzentrationen von 5 µg Con A/ml Kulturmedium verwendet, entsprechend 1 µg Con A gelöst in 18 µl Kulturmedium pro Vertiefung der Mikrotiterplatte.

Um ein gutes Wachstum der Lymphozytenkultur zu erreichen, mußte dem Kulturmedium Plasma zugesetzt werden. Am besten ist autologes Serum, gefolgt von AB-Plasma, Serum oder gepooltem menschlichem Serum. Fötales Kälberserum (FCS) wird auch angewandt, scheint aber menschliche Lymphozyten zu stimulieren (13). Bei menschlichen Zellen sind FCS-Konzentrationen von 10 - 20 % optimal. Für Mäuse und Ratten liegt die optimale Konzentration bei 10 % oder weniger (13). In dieser Arbeit wurde FCS dreißig Minuten bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert (11, 12) und in Konzentrationen von 10 % dem Kulturmedium zugesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, FCS der gleichen Charge zu verwenden, da bei unterschiedlichen Chargen abweichende Ergebnisse beschrieben wurden. In dieser Arbeit konnte kein stimulierender Effekt von FCS auf die LT festgestellt werden.

Als Kulturmedium wurde RPMI-1640 für jeden Versuch frisch angesetzt, und zwar eine Mischung aus 90 Tln. RPMI-1640 und 10 Tln. inaktiviertem FCS, der 1 % Hepes-Puffer zugesetzt wurden.

28,36 g Hepes wurden in 60 ml destilliertem Wasser (22 °C) gelöst, mit 3 N NaOH auf einen pH von 7,5 titriert und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Danach wurde die Lösung durch 0,45 µ Milliporfilter steril filtriert.

Die Antibiotikalösungen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt, da insbesondere Tetracycline bei langem Stehen in gelöstem Zustand ihre Wirksamkeit rasch verlieren (6). Von jedem Antibiotikum wurde eine Stammlösung hergestellt, die RPMI-Kulturmedium mit 1 000 µg Antibiotikum/ml Kulturmedium enthielt. Von dieser Stammlösung mit 1 µg Antibiotikum / µl Lösung, wurden für die 50 µg Konzentration im Versuch 10 µl pro Vertiefung der Mikrotiterplatte zugesetzt.

Die HBSS-Lösung von Gibco wurde mit sterilem Aqua dest. 10-fach verdünnt.

Aus einer Stammlösung von ^{3}H-Thymidin wurde eine Lösung, die 2,5 µC/ml enthält, hergestellt, von der 0,05 µC in 10 µl RPMI zugegeben wurden. Die Zugabe von weiteren 10 µl Flüssigkeit zu den Kulturen war nötig, da meist mehr als 10 µl durch Kondensation aus den Proben entwichen waren. Die Zeit, in der Thymidin in DNA eingebaut wird, entspricht den ersten acht bis zehn Stunden nach Thymidinzugabe. Je länger die Kulturdauer, umso größer war die Abweichung in den Versuchen (13). Deshalb wurde eine möglichst kurze Kulturdauer angestrebt.

Methanol (95 %) wurde mit Aqua dest. auf 5 % verdünnt und eisgekühlt.

Die 5 % TCA-Lösung wurde aus festem TCA hergestellt und eisgekühlt.

Heparin wurde im Versuch in einer Konzentration von 4 µl/ml zur Gerinnungshemmung zugesetzt, die keinen Effekt auf die LT hat (13).

Geräte

Die Zentrifugenröhrchen, 50 ml-Kolben, 10 ml-Pipetten und Pasteurpipetten wurden bei 180 °C eine Stunde im Heißluftsterilisationsgerät sterilisiert.

Die Kunststoff-Einmalpipettenspritzen wurden in Bechergläsern mit Alufoliendeckel im Autoklaven 30 Minuten bei 120 °C sterilisiert.

Silikonisieren der Zentrifugenröhrchen:
Nach mehrmaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Röhrchen nach dem Trocknen mit Silikonlösung beschichtet und bei 200 °C eine Stunde im Sterilisationsgerät erhitzt. Silikonöl erwies sich als nicht geeignet, da es sich nicht gleichmäßig auf der Glasröhrchenwand verteilte und die Trocknungszeit zu lang war.

4. Methoden

Gewinnung des Venenblutes

Gesunde, unbehandelte Kaninchen wurden verwendet. Zur Blutabnahme wurden 10 ml-Einwegspritzen mit 40 µl Liquemin versehen, deren Kanüle nach Aufziehen des Liquemin gewechselt wurde, um eine Reizung der Löffelvene zu vermeiden. Nach Rasieren der Löffelrückseite und Desinfektion mit 75 % Alkohol wurde die Vene durch kurzes Betupfen mit Xylol zur Dilatation gebracht. Anschließend wurden 10 ml Blut abgenommen. (Bei längerem Aufbewahren des Blutes, maximal 2 - 3 h, empfiehlt sich eine Lagerung bei + 4 °C.) Man muß darauf achten, daß das Blut bei der folgenden Abtrennung der Lymphozyten ebenso wie Ficoll-Paque Zimmertemperatur angenommen hat (20 - 22 °C).

Isolation der Lymphozyten

Die Lymphozytenisolation darf nicht später als 2 - 3 h nach der Blutabnahme erfolgen, um die Zellausbeute und Zellqualität nicht herabzusetzen. Bei Isolation 6 h nach Blutabnahme ergab sich eine Reduktion der Zellzahl um ein Drittel.
Die oft angewandte Trennmethode für Lymphozyten durch Glaswollfilter wurde nicht angewandt, da bei dieser Methode die adhärenten Makrophagen mitentfernt werden. Entfernung aller Makrophagen aus der Lymphozytenkultur bewirkt, daß die Stimulation der Lymphozyten gering ausfällt. Zusatz von autologen Makrophagen stellt die Reaktivität wieder her (14, 15). Dies kann durch eine Vermittlerrolle der autologen Makrophagen erklärt werden (13).

In dieser Arbeit wurde die Dichtetrennung mit Hilfe von Ficoll-Paque durchgeführt.

- Dazu wurde im sterilen Abzug das Blut im Verhältnis 1 : 1 HBSS in einem 50 ml-Kolben gut gemischt.

- Sterile, silikonisierte 25-ml Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Ficoll-Paque wurden vorbereitet und mit 10 ml des Blut-HBSS-Gemisches vorsichtig überschichtet (Abb. 2).

- Die Zentrifugenröhrchen wurden 20 Minuten bei 1 200 rpm/20 ^{o}C zentrifugiert (Abb. 3).

- Unter Belassen der Plasma-HBSS-Schicht wurde die Lymphozytenbande mittels einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in ein 25 ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

- Das Röhrchen wurde mit 10 ml HBSS aufgefüllt, die Zellen aufsuspendiert und 10 Min. bei 1 500 rpm/4 ^{o}C zentrifugiert (Abb. 4).

- Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment dreimal mit einem Gemisch aus 90 % HBSS und 10 % FCS gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde 10 Min. bei 1 500 rpm/4 ^{o}C zentrifugiert.

- Vor dem letzten Waschvorgang wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde das Sediment mit 10 ml der obigen Mischung HBSS/FCS gewaschen und ein Tropfen der Suspension in der Thomakammer ausgezählt. Nach dem dritten Waschvorgang wurde die erforderliche Zellzahl in frisch zubereitetem RPMI-1640-Kulturmedium eingestellt.

Abb. 2:
Überschichtung von Ficoll-Paque mit Blut HBSS-Gemisch

Abb. 3:
Lymphozytenbande nach Dichtetrennung in der Zentrifuge

Abb. 4:
Lymphozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens nach Waschvorgang

- wurden nach dem dritten Waschvorgang Reste von Ficoll-Paque als kleine ölartige Tröpfchen unter dem Mikroskop gefunden, wurde ein weiterer Waschvorgang angeschlossen.

Vitalitätsprüfung

Die Vitalitätsprüfung der Lymphozyten wurde mit Trypanblau vorgenommen. 0,1 ml Lymphozytensuspension wurden mit 0,9 ml 5 % Trypanblaulösung gemischt und 10 Min. stehengelassen. In der Thomakammer wurden alle Zellen, danach die blaugefärbten Zellen gezählt. Es ergaben sich Absterberaten vor Aussetzen der Zellen in das Kulturmedium von 2 % aus

$$\frac{\text{Anzahl blaugefärbter Lymphozyten (tot) x 100}}{\text{Gesamtzahl der Lymphozyten}}$$

Ansetzen der Kulturen

In den Literaturstellen werden für menschliche Lymphozytenkulturen Zellzahlen 2 x 10^6/ml (4), 1 x 10^6/ml (10) und 2 x 10^5/ 0,1 ml (8) vorgeschlagen. Für Nagetiere müssen wesentlich höhere Konzentrationen gewählt werden (bis 10^7/ml) (16).
Im Versuch wurden die isolierten Lymphozyten im PRMI-Kulturmedium mit FCS-Zusatz suspendiert, so daß in 150 µl 5 x 10^5 Lymphozyten enthalten waren. Die Mikrotiterplatten wurden mittels Eppendorf-Pipettierrechen mit je 150 µl/Vertiefung beschickt, anschließend mit den in Tabelle III angegebenen Mengen PHA beziehungsweise Con A und dem jeweiligen Antibiotikum auf 200 µl aufgefüllt.

Tabelle III: Zusammenstellung der in den Kulturen verwendeten Konzentrationen von Mitogen und Antibiotikum

RPMI-Kulturmedium mit Lymphozyten /ul	150
PHA-Lösung (Standard) /ul	2
Con A (in RPMI-Lösung) /ug	1
Antibiotikum (in RPMI-Kulturmedium)	
Gentamicin Kanamycin Tetracyclin Oxytetracyclin Erythromycin /ug	1, 2, 5, 10
RPMI-Lösung	auf 200 /ul aufgefüllt

Bebrüten der Kulturen

Die Kulturen wurden 72 h im CO_2-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet.
Normalerweise hat das Kulturmedium im CO_2-Brutschrank eine rötliche Farbe. Ein Umschalg nach Gelb (saurer Bereich) läßt Verdacht auf bakterielle Besiedlung entstehen. Nach 48 h wurden pro Kulturloch 0,05 /uC ^{3}H-Thymidin in 10 /ul RPMI-Kulturmedium gegeben.

Ernten der Kulturen

Nach 72 h wurde das Kulturwachstum abgebrochen. Die Mikrotiterplatten wurden unter dem Stereomikroskop betrachtet, um das Blastenwachstum qualitativ zu kontrollieren. Zum quantitativen Auswerten gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. Auszählen unter dem Mikroskop
2. Zählen der radioaktiv markierten Zellen im Szintillationszähler

Die erste Möglichkeit wurde zur orientierenden Beurteilung in den Versuchen verwendet. Die Blasten können gefärbt und quantitativ unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Es handelt sich dann um Blasten, wenn die Zellen mehr als 30 µ Durchmesser haben, hyperbasophil sind und 2 oder mehr Nukleoli haben (19). Die Schwierigkeit bei diesem Verfahren besteht darin, daß die Blasten in Haufen zusammenliegen und Zählen mit großen Fehlerquoten behaftet ist.

Im folgenden ist auf drei Abbildungen gezeigt, wie sich eine gut stimulierte und eine ungenügend stimulierte Kultur unterscheiden. Bei der unstimulierten Kultur schwimmen einzelne Zellen im Kulturmedium (Abb. 5). Die gut stimulierte Kultur zeigt über den ganzen Boden des Kulturloches einen dichten Rasen von Blastenhaufen (Abb. 6a). Abb. 6b zeigt einen besonders stark proliferierten Blasten.

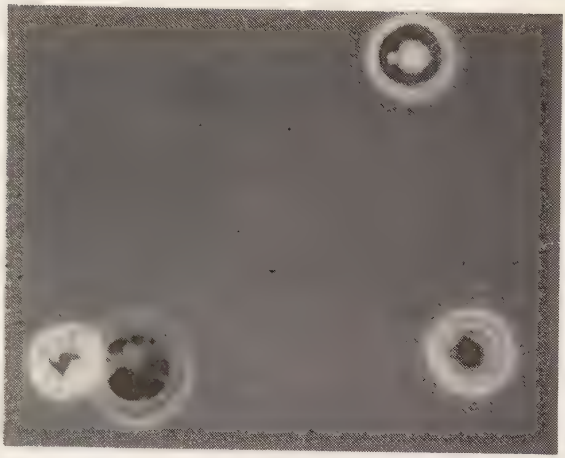


Abb. 5:
Lymphozyten in unstimulierter Kultur (Trypanblaufärbung)

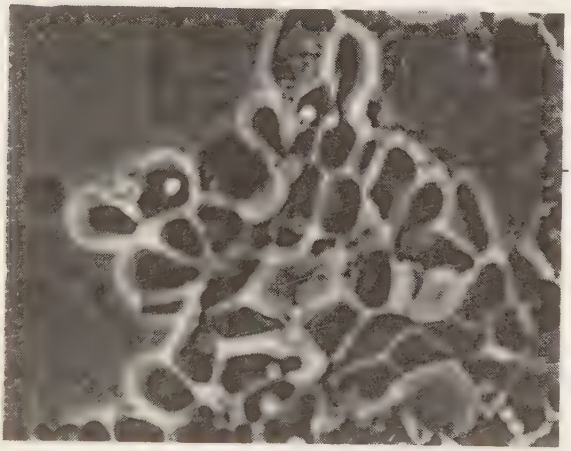


Abb. 7a:
Lymphozyten in stimulierter Kultur (Trypanblaufärbung)

Abb. 6b:
Stark profilierter Blast in stimulierter Kultur

Daher wurde die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Dazu wurden die Zellen wie folgt geerntet:
Die Zellen wurden mit Eppendorf-Einmalpipetten auf die Filterpapiere im Milliporefiltergerät überführt, die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zweimal mit je 150 µl HBSS-Puffer nachgespült und die Spüllösungen ebenfalls auf die Filter überführt. Die Zellen wurden zunächst mit 3 ml 5 % TCA, dann mit 3 ml 5 % Methanol gefällt.

Auswertung im Szintillationszähler

Nach dem Trocknen wurden die Filter in Zählröhrchen mit je 5 ml Filtercount gegeben und mindestens 6 h vor dem Zählen im Dunkeln stehengelassen. Als Maß für die Stimulation wird der Stimulationsindex bestimmt als Quotient aus Impulsen/Min. der stimulierten Probe und Impulsen/Min. der unstimulierten Probe (Kontrolle).

Variabilität der Ergebnisse

Werte, die ± 10 % des Mittelwertes betragen, sind bei einer Kulturdauer von 5 Tagen zu erwarten (13). Je stärker die Manipulation der Kulturen durch Zugabe von Substanzen wird, umso größer soll die Variabilität werden (13).
Der Quotient aus Impulsen/Min. der Antibiotikum-dotierten Kulturen und der Antibiotikum-freien Kulturen wird als Hemmung definiert.

Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung

- Art der Zentrifugenröhrchen

  Die Oberfläche von Kunststoffröhrchen zeigte sich als nachteilig für die Ausbildung einer gut abgegrenzten Lymphozyten-

bande bei Ficolltrennung. Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 2 cm und 25 ml Inhalt zeigten sich optimal zur Entnahme der Lymphozytenbande.

- Optimale Ficollkonzentration, Zentrifugiergeschwindigkeit, -temperatur

Die verwendete Ficollmenge wurde, ausgehend von den Arbeitsanleitungen für Ficoll-Paque, soweit geändert, daß sich eine gute Dichtetrennung ergab.
Daß die dort vorgeschlagenen Konzentrationen, Zentrifugentemperatur und -geschwindigkeit nicht verwendbar waren, kann an den im Gegensatz zu menschlichem Blut unterschiedlichen Dichteeigenschaften des Kaninchenblutes liegen.

- Einhalten einer sterilen Arbeitsumgebung

Die Maßnahmen zur Gewinnung sterilen Venenblutes sind vorn beschrieben worden. Selbst geringe Mengen von dabei eingeschleppten Keimen machen bei einer Kulturdauer von 72 h durch schnelles Wachstum eine Auswertung unmöglich, wenn man bedenkt, daß unter den gewählten Kulturbedingungen eine Bakteriengenerationszeit von ungefähr 20 Min. anzusetzen ist (17).
Unter dem sterilen Abzug ergaben sich bei etwaigem Luftzug ähnlich schwierige Arbeitsbedingungen durch Anflugkeime. Sie ließen sich durch ständiges Verschlossenhalten aller benutzten Medien und Geräte und nochmaliges Abflammen selbst sterilisierter Geräte, wie Pipetten etc., weitgehend eindämmen. Im Brutschrank wurden die Kulturplatten in Kunststoffolie oder, um Bildung von Kondensationswasser zu vermeiden, in sterilen Petrischalen aufbewahrt.

- Saubere Abtrennung der Lymphozyten von anderen Zellbestandteilen des Blutes

Beim Zentrifugieren der Zellen ergaben sich Schwierigkeiten beim Absedimentieren der Erythrozyten. In der Arbeit wurden solange Zentrifugierproben durchgeführt bis die Erythrozytensedimentation ausreichte. Zugabe von Dextran, Gelatine oder Methylzellulose förderte die Erythrozytensedimentation (13).

5. Versuchsergebnisse

5.1 Verzicht auf Zusatz von Antibiotika zum Medium

Es wurde, im Gegensatz zu anderen Arbeiten, auf den Zusatz von Bakterienwachstum hemmenden Antibiotika (siehe Literatur: Zugabe von Penicillin 100 IE/ml und Streptomycin 50 IE/ml) verzichtet, um die alleinige Wirkung der zu testenden Antibiotika zu untersuchen. Streptomycin verbindet sich mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen, wobei das Streptomycin-bindende Ribosomenprotein seine Konformation ändert und damit Fehler beim Ablesen des Codes auslöst (18). Es kann zu einer vollständigen Hemmung der Proteinsynthese kommen. Dabei sind Bakterien Streptomycin-empfindlicher als Säugetierzellen (18). Es wird beschrieben, daß Streptomycin in der entsprechenden Konzentration die LT stimulierend beeinflußt (9). Eine zusätzliche Wirkung des Streptomycins zu der hemmenden Wirkung der untersuchten Antibiotika war nicht auszuschließen. Es schien daher zweckmäßig, Streptomycin auch mit dem erhöhten Risiko bakterieller Besiedlung nicht anzuwenden.

Für Penicillin verweise ich auf entsprechende Literaturstellen. Allein der Wirkungsmechanismus des Penicillins (Angriff an der Bakterienzellwandsynthese) macht einen Einfluß auf die LT unwahrscheinlich. Es ist jedoch beschrieben worden, daß Penicillinzusatz zum Medium menschliche Lymphozyten stimuliert (9, 13). Über ähnliche Ergebnisse wird berichtet, wenn Lymphozyten von Blutspendern mit Penicillin-Allergie verwendet werden (1, 19).

5.2 Durchschnittliche Stimulationsraten bei Con A und PHA M

Es wurden die Stimulationsraten bei PHA M bei Zugabe von 0,5; 1; 2,5 und 10 µl/ml geprüft. Dabei ergab sich eine optimale

Stimulation bei einer Konzentration von 10 µl/ml. Die durchschnittliche Stimulation bei dieser Konzentration - 4,4 - war das Ergebnis aus fünf Versuchsreihen mit je drei Einzelwerten (5,42; 1,59; 2,6; 5,0; 7,3).

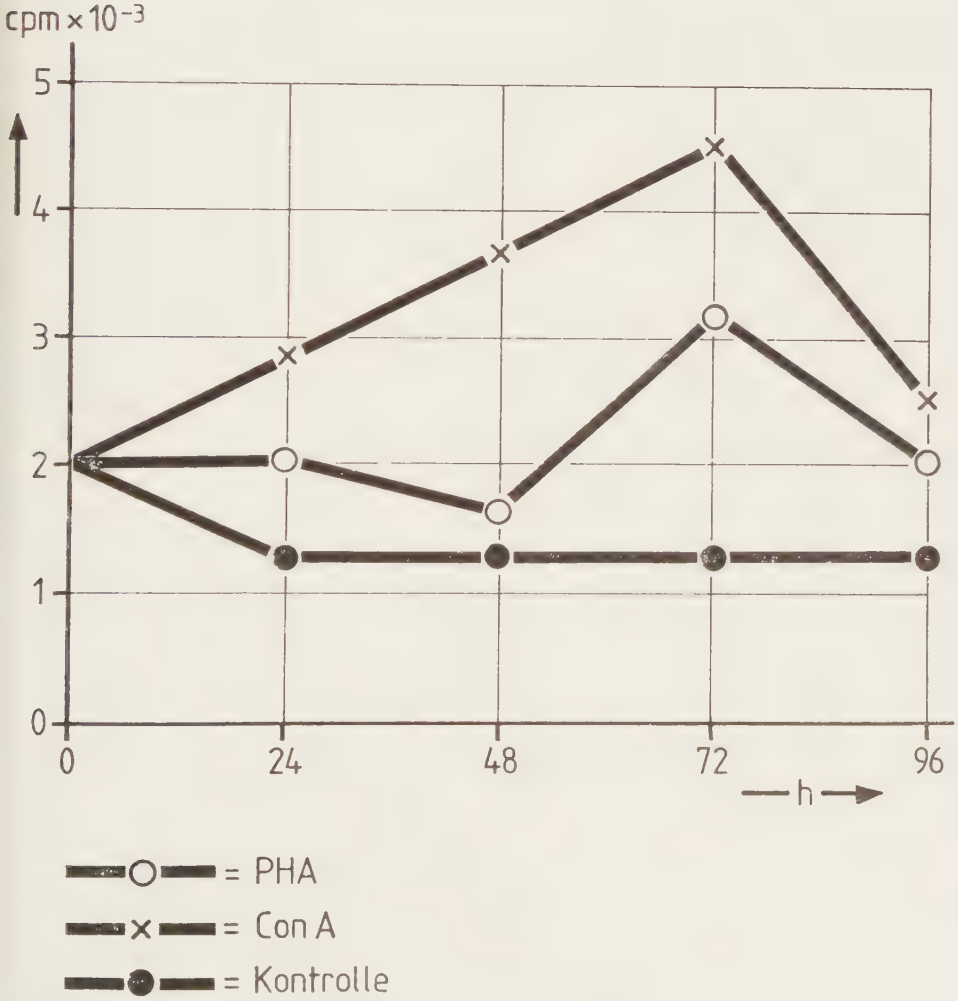
In ähnlicher Weise wurde die optimale Con A-Konzentration ermittelt. Es ergab sich eine optimale Stimulation bei einer Con A-Konzentration von 5 µg/ml. Die durchschnittliche Stimulation bei dieser Konzentration - 3,8 - war das Ergebnis aus fünf Versuchsreihen mit je drei Einzelwerten (1,9; 2,3; 5,0; 3,3; 6,9).

Die durch Con A und PHA ausgelöste Aktivierung der T-Zellen wird durch verschiedene andere Zellen (Makrophagen und B-Zellen) und deren Produkte verstärkt. Con A regt die T-Zellen zur Proliferation an und fördert die Entwicklung von Effektor-Zellen. Zur Induktion bei optimal hoher Konzentration von Con A sind entweder Serum oder adhärente Zellen nötig. Bei niedrigen Dosen sind Serum und adhärente Zellen nötig. Anwesenheit von FCS verlangt 10 mal höhere Konzentrationen für eine optimale Aktivierung. Dies läßt sich durch Bindung von Con A an Serumproteine erklären (20).

5.3 Kinetik des ^{3}H-Thymidineinbaus

Es wurden für die Erstellung einer Einbaukinetik für ^{3}H-Thymidin zu gleicher Zeit 5 Kulturplatten mit je 6 Kulturen angesetzt. Zum Zeitpunkt 0, 24, 48, 72, 96 h wurden die Kulturen unterbrochen. Die in (Abb. 7) wiedergegebene Kinetik entspricht dem durchschnittlichen Thymidineinbau. Die Kinetik zeigt in den ersten 24 h ein rasches Absterben der Lymphozyten.

Abb.7: Wachstumskinetik peripherer Kaninchenlymphozyten in vitro bei Stimulation durch PHA M und CON A



Diese hohe Absterberate wurde mit Trypanblaufärbung nachgeprüft. Die mit Con A stimulierten Lymphozyten zeigten nach 48 h eine Steigerung der Thymidineinbaurate um das Drei- bis Vierfache. Die PHA M-Stimulation erbrachte nicht ganz so hohe Proliferationsraten nach 48 h.
Nach Kulturdauer von 72 h war die Absterberate höher als die Proliferationsrate. Entsprechend diesen Ergebnissen war die Thymidierung nach 48 h und Ernte der Lymphozyten nach 72 h angezeigt.

5.4 Wirkung von Antibiotika auf mitogen-stimulierte Lymphozyten

Zur Ermittlung der Wirkung wurden, soweit die Versuchsbedingungen es erlaubten, möglichst drei Versuchsreihen zu je drei Proben durchgeführt. Dann wurden Mittelwert und mittlerer Fehler bestimmt. Die Mittelwerte bilden die Grundlage der Kurven. Durch Verbinden der Mittelwerte ergeben sich Hemmungskurven, die bei steigenden Antibiotikakonzentrationen eine zunehmende Hemmung der LT anzeigen.

Bei Gentamicinzusatz (Abb. 8) von 5 µl/ml war die LT um 10 % eingeschränkt. Bei 10 µg/ml verdoppelte sich die Hemmung. Bei 25 µg/ml hatte sie sich verdreifacht, bei 50 µg/ml vervierfacht, d.h. daß bei dieser Konzentration die Hemmung der LT auf 50 % gestiegen war.

Für Kanamycin (Abb. 9) war die Hemmung schwächer. Bei Konzentrationen von 5 µg/ml wurde keine Hemmung gefunden. Bei Konzentrationen von 10, 25, 50 µg/ml stieg die Hemmung auf 19, 28 bzw. 41 % an.

Tetracyclin (Abb. 10) zeigte die stärkste Hemmung der LT. Bei 5 µg/ml wurde bereits eine Hemmung von 25 %, bei 25 µg/ml und 50 µg/ml wurde eine Hemmung von 66 bzw. 87 % gemessen.

Bei Zusatz von Oxytetracyclin (Abb. 11) in einer Konzentration von 5 µg/ml wurde eine geringe Hemmung von 6 % gemessen, bei Konzentrationen von 10, 25 und 50 µg/ml wurden 36, 64 und 74 % Hemmung gefunden, die damit etwas geringer waren als bei Tetracyclin.

Die Hemmungswerte von Erythromycin (Abb. 12) lagen ähnlich wie die für Kanamycin. Es zeigte sich aber schon eine Hemmung von 10 % bei der niedrigsten Konzentration von 5 µg/ml.

Abb.8: Effekt verschiedener Gentamicin-Konzentrationen auf die Lymphozytentransformation peripherer Kaninchenlymphozyten, gemessen an der 3H Thymidin-Einbaurate nach 72 Stunden, bei Stimulation durch PHA (○), bei Stimulation durch Con A (×).

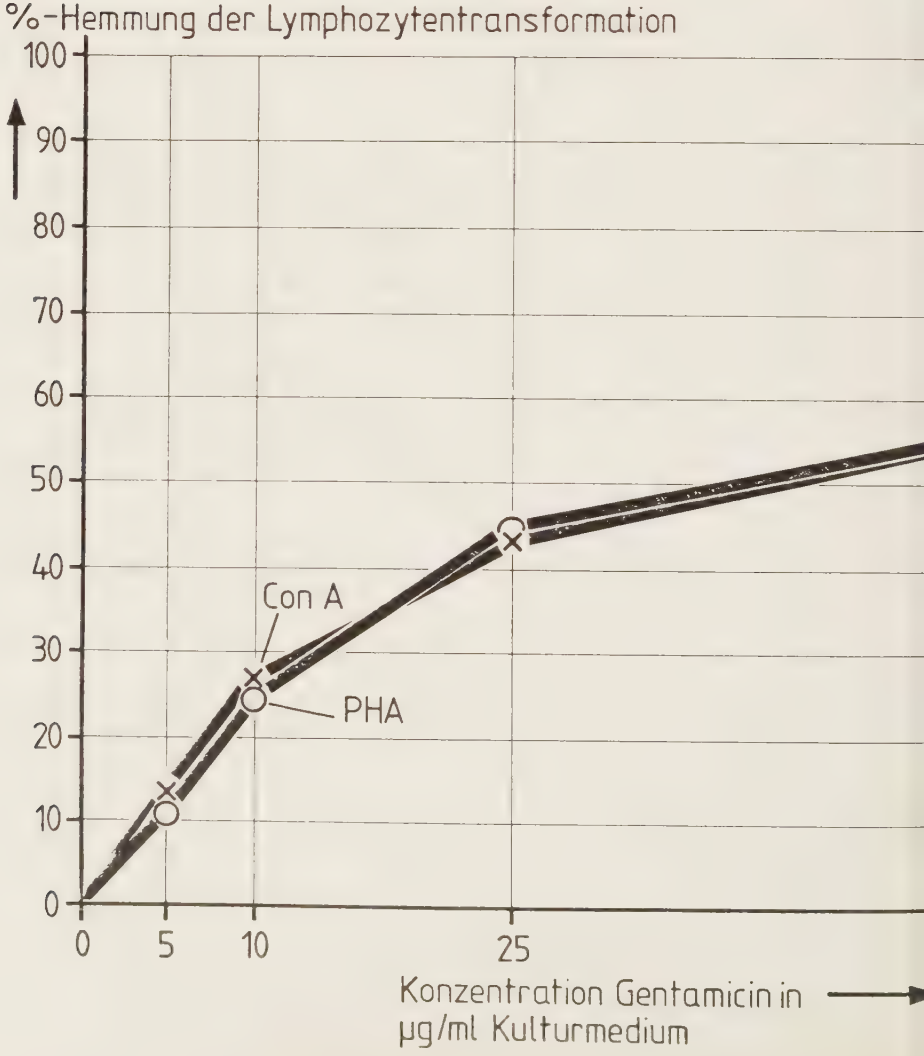


Abb. 9: Effekt verschiedener Kanamycin-Konzentrationen auf die Lymphozytentransformation peripherer Kaninchenlymphozyten, gemessen an der 3 H Thymidin-Einbaurate nach 72 Stunden, bei Stimulation durch PHA (○), bei Stimulation durch Con A (×).

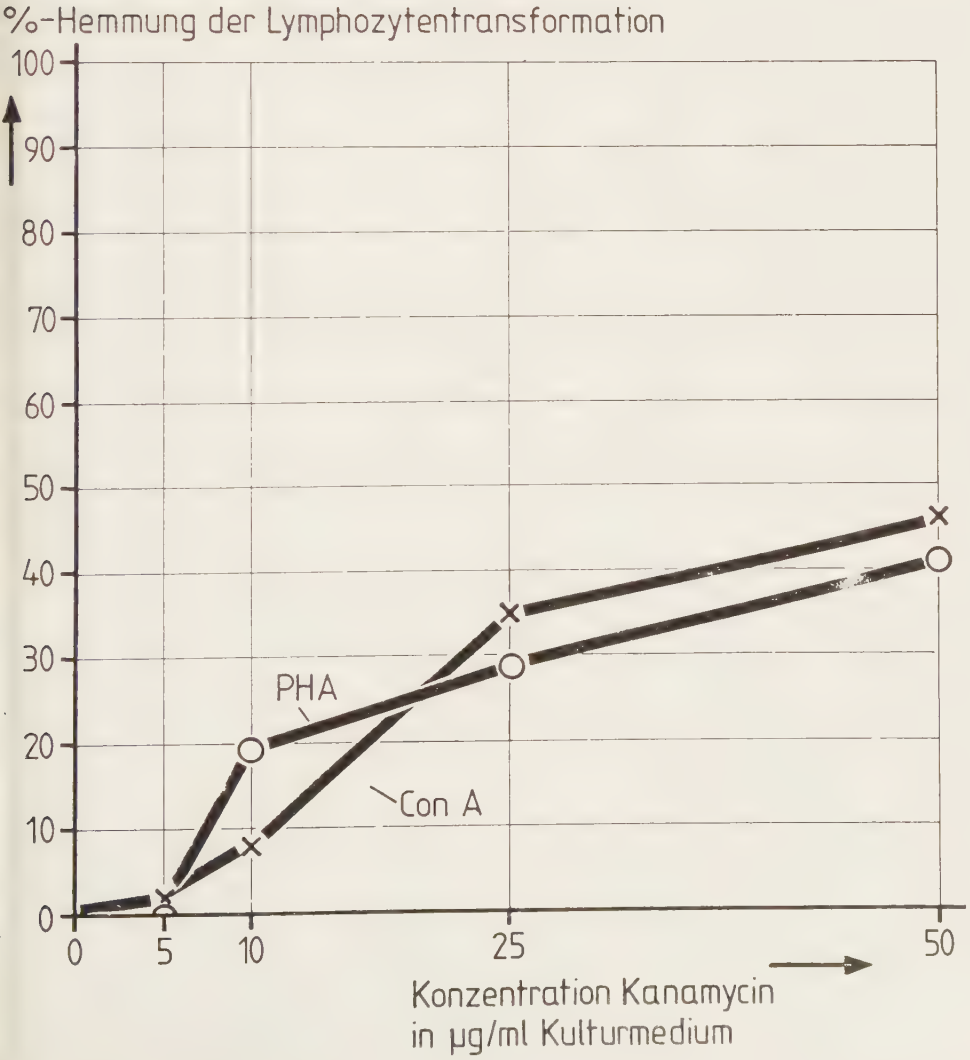


Abb.10: Effekt verschiedener Tetrazyklin-Konzentrationen auf die Lymphozytentransformation peripherer Kaninchenlymphozyten, gemessen an der 3H Thymidin Einbaurate nach 72 Stunden, bei Stimulation durch PHA (○), bei Stimulation durch Con A (×).

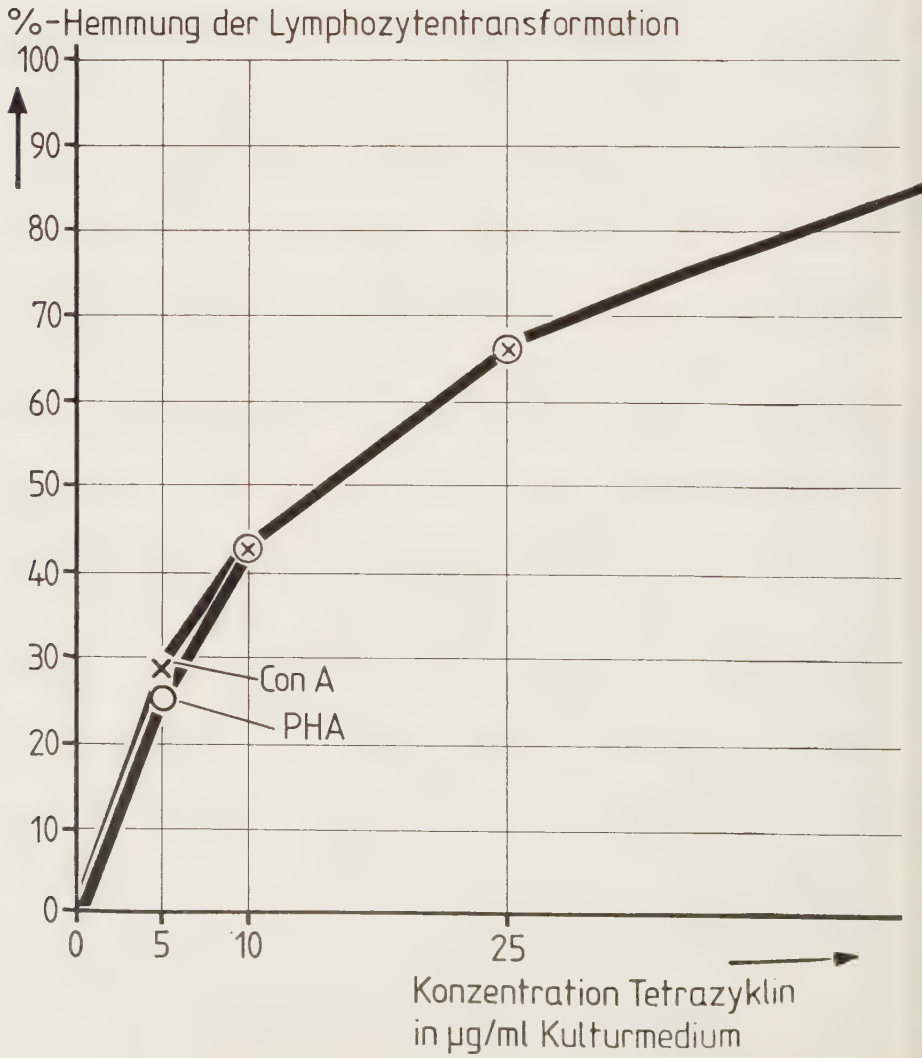


Abb.11: Effekt verschiedener Oxytetrazyklin-Konzentrationen auf die Lymphozytentransformation peripherer Kaninchenlymphozyten, gemessen an der 3H Thymidin-Einbaurate nach 72 Stunden, bei Stimulation durch PHA (○), bei Stimulation durch Con A (×).

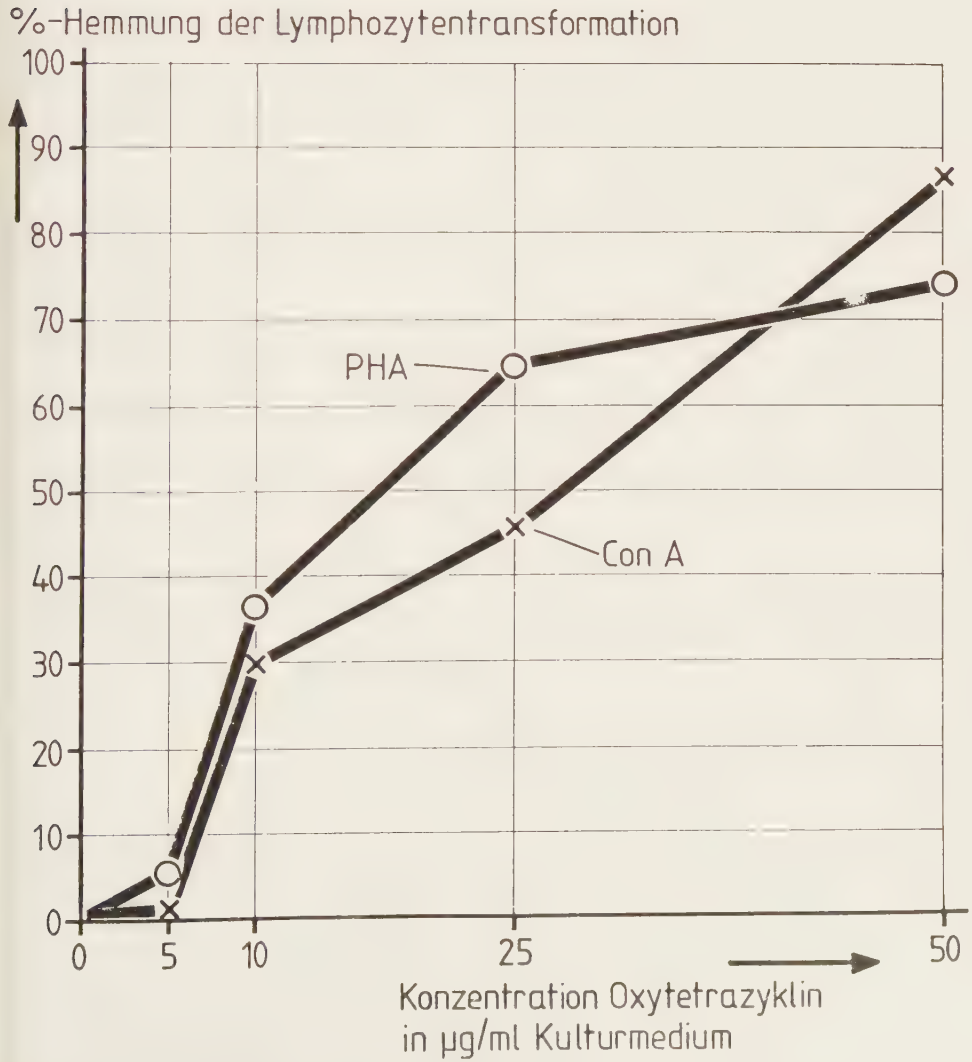
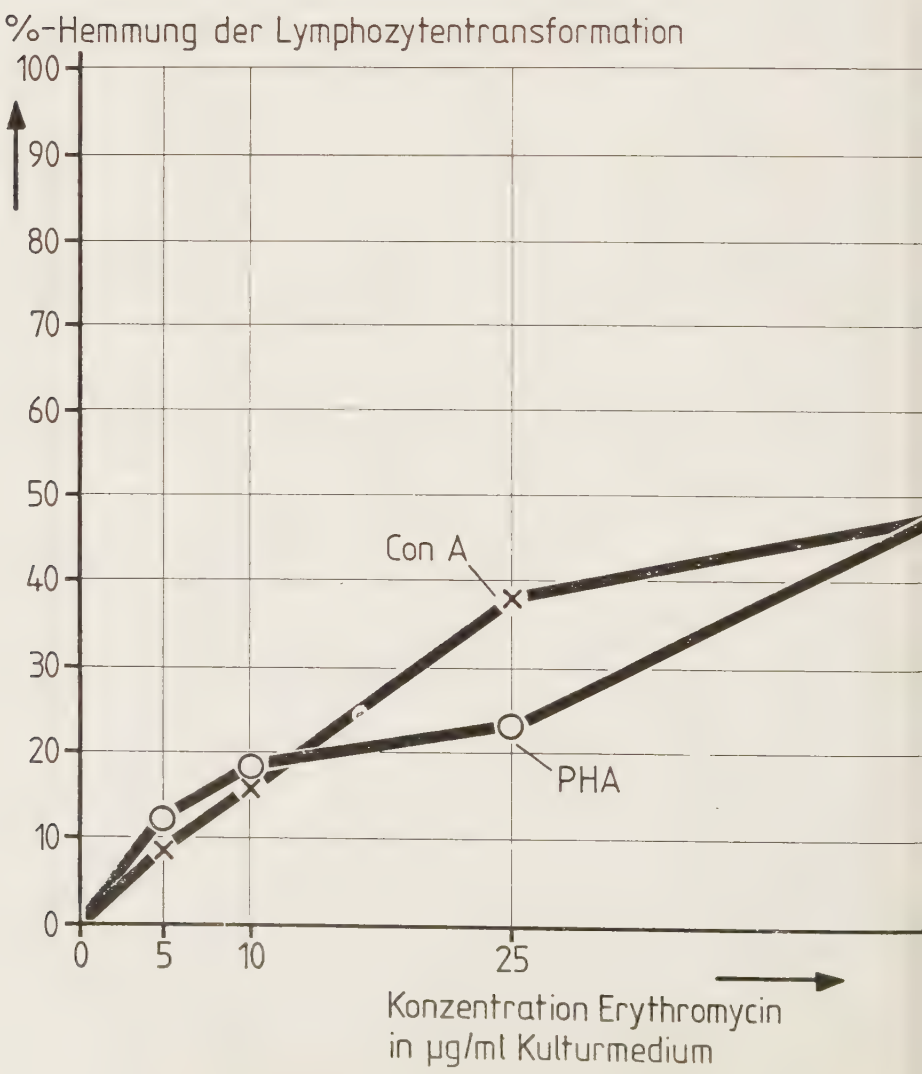


Abb.12: Effekt verschiedener Erythromycin-Konzentrationen auf die Lymphozytentransformation peripherer Kaninchenlymphozyten, gemessen an der 3 H Thymidin-Einbaurate nach 72 Stunden, bei Stimulation durch PHA (○), bei Stimulation durch Con A (×).



Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Tetracyclin und Oxytetracyclin die stärkste Hemmung bewirken. Gentamicin, gefolgt von Erythromycin und Kanamycin bewirken eine schwächere, aber immer noch bedeutende Hemmung der Blastogenese. Tetracyclin und Oxytetracyclin zeigen bei Konzentration von 50 /ug/ml Zytotoxizität.

5.5 Hemmung der LT bei im menschlichen Serum erreichbaren Antibiotikakonzentrationen

Um aus den Versuchen Rückschlüsse auf mögliche Hemmung der LT und damit Hemmung des Immunmechanismus im menschlichen Organismus ziehen zu können, wurde die Hemmung der LT bei im menschlichen Serum erreichbaren Antibiotikakonzentrationen in Tabelle IV zusammengestellt. Die geringste Hemmung zeigt sich bei Oxytetracyclin, die stärkste bei Kanamycin.

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß häufig angewendete Antibiotika, wie Gentamicin, Kanamycin, zwei Vertreter der Tetracyclingruppe: Tetracyclin und Oxytetracyclin und das Makrolidantibiotikum Erythromycin die LT mitogen-stimulierter Kaninchenlymphozyten hemmen. Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen können bei klinisch üblichen Dosierungen im menschlichen Serum auftreten. Aus der Tabelle IV läßt sich die dabei zu erwartende Hemmung der LT ablesen.

Tabelle IV: Hemmung der LT bei im menschlichen Serum maximal erreichbaren Antibiotikakonzentrationen bei niedriger, mittlerer und hoher Dosierung (unter Verwendung von Literatur (6))

Antibiotikum	Art der Gabe intramuskulär (i.m.) oder oral	Dosis mg/kg	Serumspiegel µg/ml	Hemmung der Stimulation der LT durch PHA M %	Con A %
Gentamicin	i.m.	0,2	1,1		
	i.m.	0,8	5,1	~11	~14
	i.m.	3,2	14,3	~30	~30
Kanamycin	i.m.	3,5	22	~25	~27
	i.m.	7,5	30	~30	~37
	i.m.	14,5	60	>40	>46
Tetracyclin	oral	3,5	2,2	~ 9	~ 9
	oral	7,5	3,6	~17	~17
	oral	15	4	~22	~22
	oral	30	8	~38	~38
Oxytetracyclin	oral	3	1,5	< 1	< 1
	oral	3,5	2,2	~ 2	~ 1
	oral	7,5	2,4	~ 3	~ 1
Erythromycin	oral	3,5	2,9	~ 7	~ 5
	oral	7,5	4	~11	~ 6

Wenn diese Antibiotika intravenös gegeben werden, ist zu Beginn einer antibiotischen Behandlung ein höherer Serumspiegel zu erreichen (Tabelle V).

Tabelle V: Hemmung der LT bei im menschlichen Serum maximal erreichbaren Antibiotikakonzentrationen bei i.v. Gabe (unter Verwendung von Literatur (6))

Antibiotikum	Dosis mg	Serumspiegel /ug/ml	Hemmung der LT bei Stimulation durch PHA M %	Con A %
Gentamicin	80 80	28	~50	~45
Kanamycin	Kurzinfusion: 1 000	68	>41	>46
	Dauertropf: 2 000	25	~27	~35
Tetracyclin	100	3	~ 4	~ 1
Oxytetracyclin	250	25	~65	~45
	500	40	~70	~87
	2 000	60	>70	>87
Erythromycin	250	10	~18	~16
	Kurzinfusion: 500	20	~24	~30

Bei diesen Serumspiegeln ist eine noch eingreifendere Hemmung der LT zu erwarten, da sich die Hemmung der LT in den Versuchen als dosisabhängig erwiesen hat. In dieser Arbeit wurde mit pflanzlichen Mitogenen in vitro eine LT erreicht. Dies entspricht in etwa einer Auseinandersetzung mit Antigenen. Bakterielle Antigene lösen beim Menschen die Immunabwehr aus. Es sind Versuche

mit Bakterienwandbestandteilen, die Antigencharakter haben, durchgeführt worden. Diese Lipopolysaccharide (LPS) lösten eine Blastentransformation aus, wobei LPS selektiv die B-Zellen aktivierte. So scheint es gerechtfertigt, die mitogenstimulierte LT als Modell für die Immunreaktion im menschlichen Organismus zu benutzen.

Bei Betrachtung der Anwendungsgebiete der Antibiotika lassen sich weitere unerwünschte Wirkungen der Antibiotika auf die Immunabwehr finden.

Die Aminoglykosidantibiotika greifen mit ribosomalem Angriffspunkt in die Proteinbiosynthese ein. Gentamicin wird häufig bei akuten und chronischen Harnweginfektionen gegeben, wobei Nierenfunktionsstörungen auftreten können, und die Gefahr einer Kumulation besonders groß ist. Die Toxizität des Antibiotikums hängt von der Dosis und Zeit ab, über die es gegeben wurde. Angaben über den toxischen Serumspiegel von Gentamicin schwanken zwische 2,95 - 12,5 µg/ml (21). Wie in den Versuchen gezeigt, lag bei dieser Konzentration die Hemmung der LT bei 11 - 27 %. Kanamycin hat klinisch ähnliche Nebenwirkungen wie Gentamicin. Die spezifische Hemmung der LT ist etwas geringer als bei Gentamicin, da aber klinisch ca. vierfach höhere Dosen gegeben werden müssen, werden entsprechend hohe Serumkonzentrationen erreicht, die in den Versuchen eine Hemmung der LT von mehr als 46 % ergab

Tetracycline hemmen die Proteinbiosynthese, indem sie die Bindung der t-RNA an den m-Ribosomenkomplex verhindern (18). Aber bis ins letzte ist der Mechanismus der Tetracyclinwirkung noch nicht geklärt. Tetracycline in Konzentrationen von 1 - 10 µg-ml werden nach bisherigen Versuchen als nicht hemmend bezeichnet (4), andererseits sollen sie die LT in diesen Konzentrationen

bis etwa 25 % hemmen (8). In höheren Konzentrationen (50 - 100 µg/ml) hemmt Tetracyclin die DNA-Synthese (8). Die Toxizität von Tetracyclin in den genannten Konzentrationen wird in dieser Arbeit bestätigt. Die LT wird in Konzentrationen ab 5 µg/ml gehemmt. Bei hohen Antibiotikumkonzentrationen lassen sich Gemeinsamkeiten zwischen Tetracyclinen und Immunsuppressiva vermuten. Es wurden bei klinischer Anwendung von Tetracyclinen akute Leberzellnekrosen beobachtet, die Ausdruck von cytotoxischen Nebenwirkungen sein können (8). Über die Cancerogenität liegen keine Erfahrungen vor. Solche Effekte von Tetracyclinen werden aber bei Langzeitanwendungen wahrscheinlicher, so bei Therapie der Akne vulgaris und der chronischen Bronchitis (8). Über immunsuppressive Nebenwirkungen von Tetracyclinen wird bereits berichtet (8).

Erythromycin hemmt die Proteinsynthese mit ribosomalem Angriffspunkt. Es ist dasjenige der fünf untersuchten Antibiotika, das hauptsächlich über Galle und Stuhl ausgeschieden wird und so bei Nierenfunktionsstörungen nicht kumuliert. Die Gefahr eines zu hohen Serumspiegels ist daher nicht so groß.

Alle hier untersuchten Antibiotika, bis auf Erythromycin, kumulieren bei Nierenschäden mit verzögerter Urinausscheidung. Dies kann besonders bei chronisch Kranken der Fall sein, wo Langzeitbehandlung nötig wird, da dann über längere Zeit hohe Serumkonzentrationen erreicht werden. In solchen Fällen muß auf Dosisreduzierung geachtet werden, da die Schwächung des Immunsystems entsprechend der Antibiotikumkonzentration im Serum ansteigt. Gentamicin und Erythromycin haben eine kurze Serumhalbwertzeit von 1 - 2 h, Kanamycin eine Serumhalbwertzeit von 2 - 4 h und Tetracyclin eine solche von 8 - 9 h. Demgegenüber stehen die pharmakologischen Halbwertzeiten, die bei Gentamicin und Kanamycin sehr lang, bei Erythromycin und Tetracyclin etwas kürzer sind.

Es wäre daher zu diskutieren, ob nicht bei Kumulation diese Halbwertzeiten berücksichtigt werden müssen. Dies wird in vielen Kliniken bereits an Hand von Spiegelbestimmungen im Serum, insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion durchgeführt.

Zu der Häufigkeit der Anwendung der hier untersuchten Antibiotika in Krankenhäusern sei folgendes gesagt (22):

Tetracycline fallen unter die Antibiotika, die in 32 % der Anwendungen eingesetzt werden. Die Aminoglykosidantibiotika werden in 3 % der Fälle eingesetzt, Erythromycin wird in etwa 8 % der Fälle verwendet. Es wäre zu diskutieren, ob nicht, wo eben möglich, besonders bei Langzeitbehandlung mit den untersuchten Antibiotika und Anwendung bei Patienten mit insuffizientem Immunsystem auf Antibiotika anderer Gruppen, die nicht in den Zellstoffwechsel eingreifen, umgestiegen werden sollte, wie Penicilline oder Cephalosporine. Zugleich muß eine frühzeitige bakteriologische Diagnostik mit Bestimmung des Krankheitserregers und Auswahl eines spezifischen Antibiotikums durchgeführt werden. Solches wäre angebracht bei Patienten mit bakteriellen Infektionen, die unter schweren, abwehrschwächenden Krankheiten leiden. Bei ihnen kann sich die Infektion unter Antibiotikatherapie weiter ausbreiten (23), besonders dann, wenn man, um ein möglichst breites Spektrum von Erregern bekämpfen zu können, mehrere Antibiotika gleichzeitig gibt. Gerade unter einer solchen Therapie kommen gehäuft Superinfektionen durch Viren und vor allem durch Pilze vor (4). Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre in der Hemmung der LT und dadurch der Immunabwehr zu suchen. Antibiotika entfernen die bakteriellen Krankheitserreger nicht. Sie können entweder die Bakterien abtöten oder das Bakterienwachstum hemmen. Bei intakter Immunabwehr ist dann die Entfernung der toxischen Abbauprodukte aus dem Körper gewährleistet. Bei Schwächung des körpereigenen Immunsystems könnten Antibiotika dazu führen, daß es dem Körper nicht gelingt, eine Infektion wirksam zu bekämpfen (4). Deshalb wäre

eine T-Zellen-Suppression als Ursache für eine Infektion oder Exazerbation der Infektion zu diskutieren (4). Immundefektkrankheiten wurden vor der antibiotischen Ära nicht beschrieben, so daß man folgern könnte, daß die Antibiotikatherapie zu Immundefekten führen kann (23).

Von anderen Antibiotika ist schon eine Wirkung auf die LT berichtet worden, so von den Jonophoren Nigericin (24) und Valinomycin (25). Beide hemmen die LT menschlicher Lymphozyten bei Stimulation durch PHA, Con A und andere Mitogene nur während der frühen Mitosestadien. Ein anderer Mechanismus einer Antibiotikumwirkung wird bei der Ampicillinallergie deutlich. Je höher das Molekulargewicht von Arzneimitteln ist, umso größer ist die Möglichkeit, daß es allergische Reaktionen auslöst (26). Polymeres Ampicillin, (Molekulargewicht 3 500 - 4 000) stimuliert die LT. Ähnliches zeigte sich für Erythromycin-Estolat. Hier wurde eine Sensibilisierung bei Konzentrationen von 5 µg/ml nachgewiesen. Lymphozyten des sensibilisierten Patienten zeigten unter PHA-Stimulation eine Blastogenesesteigerung. In Konzentrationen von 50 µg/ml wirkte Erythromycin-Estolat toxisch [illegible].

Welche Faktoren sind nun entscheidend für die Wirkung eines Antibiotikums auf die Lymphozytentransformation?
Antibiotika sind für den Körper antigene Strukturen, wie die Mitogene PHA und Con A und auch die bakteriellen Antigene. Wie die Wirkung eines Antigens auf das Immunsystem ist, hängt von seiner Struktur ab. Um eine Immunantwort zu bewirken, sind polymere Strukturen (Immunogen) nötig (27). Als Auslöser einer Immunantwort, d.h. Bildung von Antikörpern, sind Antibiotika zu klein. Sie haben wahrscheinlich Haptencharakter und können Antikörper binden. Die auf die LT im Sinn einer Stimulierung

oder Hemmung einwirkenden Substanzen: Bakterielle Antigene, Mitogene, Antibiotika reagieren über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus, der Rezeptoren entsprechen könnte, mit der Lymphozytenmembran. Die Antwort, die eine Substanz im Organismus auslöst, kann verschiedener Art sein:

- Entwicklung einer Immunabwehr entsprechend einer Immunreaktion von 1 % der spezifischen, für diese Substanz zuständigen Zellen.
- Entwicklung einer Allergie entsprechend einer überschießenden Reaktion bei erneutem Kontakt mit der Substanz.
- Hemmung der Immunantwort über immunsuppressive Mechanismen.
- Toxische Wirkung auf das Immunsystem

Eine Reaktion der ersten Art entspräche einer geringen Stimulation durch das Antibiotikum, wie sie von Munster (4) bei Gentamicin beschrieben wurde. Meist handelt es sich bei Allergie auslösenden Substanzen um solche, die ein hohes Molekulargewicht haben, also gleichzeitig die Bildung von Antikörpern induzieren können und mit Antikörpern reagieren können. Dem dritten und vierten Reaktionsmechanismus entspricht die in dieser Arbeit beschriebene Wirkung der Antibiotika auf die LT, d.h. die Hemmung der LT scheint über den Mechanismus einer direkten Schädigung abzulaufen, die bei hoher Konzentration toxisch sein kann.

7. Zusammenfassung

Die Wirkung von Antibiotika auf durch PHA bzw. Con A stimulierte Kaninchenlymphozyten wurde in vitro getestet. Die in Konzentrationen von 5; 10; 25; 50 µg/ml zugegebenen Antibiotika bewirkten alle eine dosisabhängige Hemmung der Lymphozytentransformation. Die Aminoglykosidantibiotika Gentamicin und Kanamycin bewirkten annähernd gleich starke Hemmung. Tetracyclin hatte stärker hemmende Effekte als die Aminoglykoside und auch als Oxytetracylin. Die Hemmung durch Erythromycin lag etwas unter dem Bereich derjenigen der Aminoglykoside. Es wird diskutiert, ob auf Grund der aus den Ergebnissen dieser Arbeit zu ersehenden Antibiotikawirkung auf die Lymphozytentransformation eine entsprechende Hemmung des menschlichen Immunsystems unter Antibiotikagabe abzuleiten ist. Wenn diese Ableitung nahe liegt, sollte die Indikation zur Gabe von Antibiotika, die in das Immunsystem eingreifen, strenger geprüft werden.

Literaturverzeichnis

1- Jäger. L. 1978. Klinische Immunologie und Allergologie, Teil I. Fischer Verlag

2- Möller G., O. Sjöberg, und J. Anderson. 1972. Mitogen-induced lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro: effect of mitogens selectively activating T or B cells. Eur. J. Immunol. 2: 586-592

3- Greaves, M. F., G. Jannossy und M. Doenhoff. 1974. Activation of human T und B lymphacytes by polyclonal mitogens. Nature 1974. 248: 698-701

4- Munster, A. M., C. Boyd Loadholdt, A. G. Leary und M. A. Barnes. 1977. The effect of antibiotics on cell-mediated immunity. Surgery 81: 692-695

5- Forth W., D. Henschler und W. Rummel. 1975. Allgemeine und spezielle Pharmakologie. B. J. Wissenschaftsverlag

6- Walter A. M., L. Heilmeyer Begr., 1. Herausgeber H. Otten, M. Plempel und W. Siegenthaler. 1975. Antibiotikafibel. Thieme Verlag

7- Dam W. C., F. D. Malkinson und H. Gewurz. 1975. The effect of common antibiotics on lymphocyte transformation. Experientia 31 (3): 375-376

8- Thong Y. H. und A. Ferrante. 1979. Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses by tetracycline analogues. Clin. exp. Imminol. 35: 443-446

9- Johnson G. J. und P. S. Russell. 1965. Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium. Nature 208: 343

Cooksley W. G. E. und L. W. Powell. 1977. Erythromycin Jaudice: Diagnosis by an in vitro challenge test. Aust. N. Z. J. Med. 7: 291-293

Wilson D. B. 1967. Quantitative studies of the mixed Lymphocyte interaction in rats. J. Exp. Med. 126: 625

Roitt J. M. 1968. Leitfaden der Immunologie. Steinkopf Verlag, Darmstadt

Valentine F., Bloom, R. Barry und P. R. Glade (ED.). 1971. Lymphocyte transformation: The proliferation of human blood lymphocytes stimulated by antigen in vitro. In vitro methods in cell-mediated immunity. Symposium XXIV. Illus. Academic Press: New York, U.S.A.: 443-454

Hersh E. M. und J. E. Harris. 1968. Blastogenic response of human peripheral blood leukocytes. J. Immunol. 100: 1184

Oppenheim J. J., B. G. Leventhal und E. M. Hersh. 1968. The transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli. J. Immunol. 101: 262

Smith C. I. E. und L. Hammerstroem, 1978. B-cell activating properties of Polymyxin B. Scand. J. Immunol. 7 (1): 67-72

Buselmeier W. 1975. Biologie für Mediziner. Springer Verlag

Buddecke E. 1977. Grundriß der Biochemie. Walter De Gruyter Verlag, Berlin

19- Saurat J. H., C. Ponvert, C. Burtin, C. Soubrane, B. Lebel, F. Beuchter und J. Paupe. 1976. Lymphocyte transformation, leucocyte migration, specific IgE, IgG and IgM before, during, and after Penicillin treatment without adverse reaction. Acta Allergologica 31: 1-17

20- Persson U., P. H. Bick. L. Hammerstroeme, E, Moeller und C. I. Smith. 1979. Different requirements für T cells responding to various doses of Concavalin A. Scand. J. Immunol 8 (4): 291-301

21- Erlebach R. 1977. Zur Pharmakokinetik des Gentamicin. Diss.

22- Otten H. und M. Plempel. 1977. Antibiotikafibel Teil 1. Thieme Verlag

23- Reaburn J. A. 1972. Antibiotics and immunodeficiency. Lancet 2: 954

24- Daniele R. P., S. K. Holian und P. D. Nowell. 1978. A potassium ionophore (Nigericin) inhibits stimulation of human lymphocytes by mitogens. J. Exp. Med. 147: 571-581

25- Daniele R. P. und S. K. Holian. 1976. A potassium ionophore (Valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (10): 3599

26- Webster A. W. und R. A. Thompson. 1974. The Ampicillin rash. Lymphocyte transformation by Ampicillin polymer. Clin. Exp. Immunol. 18 (4): 553-564

27- Bier O.G., Götze D., Mota I. und Dias da Silva W. 1979. Experimentelle und klinische Immunologie. Springer Verlag

28- Wilhelm James M., John J. Jessop und Susan E. Pettitt. 1978. Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: Stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells. Biochemistry 17:1149

29- Singh Arjun, Doris Ursic und Julian Davies. 1979. Phenotypic suppression and mesreading in Saccharomyces cerevisae. Nature 277:146

LEBENSLAUF

Ich wurde am 17. November 1956 als Tochter des Chemikers Dr. Ludwig Bottenbruch und seiner Ehefrau Lieselotte Bottenbruch geb. Breuer in Krefeld geboren.

Von 1963 bis 1966 besuchte ich die Diesterwegschule, Städtische Evangelische Volksschule, in Krefeld-Bockum, ab 1966 das Städtische neusprachliche Mädchengymnasium in Krefeld-Uerdingen, wo ich im Juni 1975 das Zeugnis der Reife erhielt. In der Medizinischen Klinik der Universität Bonn habe ich vom 15.10.1975 bis zum 15.4.1976 das Freiwillige Soziale Jahr des Deutschen Roten Kreuzes absolviert. Mit dem Sommersemester 1976 habe ich das Studium der Humanmedizin in Düsseldorf begonnen, Physikum, 1. und 2. Staatsexamen 1978, 1979 und 1981 bestanden.

Herrn Prof. Dr. H. Brunner danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und seine wertvollen Anregungen in häufigen Diskussionen.

Dem Institut für Immunologie der Bayer AG, Elberfeld, insbesondere Herrn Dr. Opitz, danke ich für viele methodische Hinweise und Hilfe mit Geräten und Reagenzien.